GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF SUR SANG MATERNEL

INDICATIONS ET RETOUR D'EXPERIENCE

EFS Rhône Alpes, Lyon, site du Groupement Hospitalier Est

http://lbm.efs-rhonealpes.dondusang.net

1991, polymorphisme génétique du gène *RHD* : génotypage *RHD* fœtal par amniocentèse

1998, Denis Lo, présence d'ADN libre fœtal sur plasma maternel, nombreuses applications

génotypage *RHD* fœtal sur sang maternel

Cas n°1

Madame Marie B. 35 ans, G3P3 vient consulter à 16 SA. Elle vous apprend qu'au cours de sa précédente grossesse, elle s'est immunisée contre l'antigène érythrocytaire D (RH1). Son mari est B Rhésus positif (RH:1).

Vous lui proposez d'effectuer un génotypage *RHD* fœtal sur plasma maternel.

Vous faites la prescription: que devez vous joindre à l'ordonnance?

Fiche de consentement éclairé: comment l'obtenir? sur le site http://lbm.efs-rhonealpes.dondusang.net

Elle vous pose plusieurs questions:

-Quel est cet examen?

-Quel est l'intérêt de le réaliser?

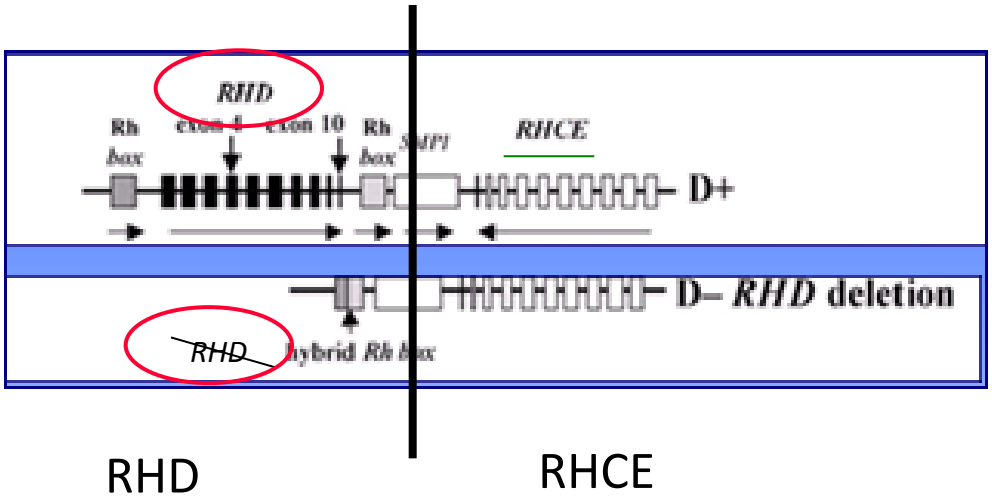
-Comment est réalisé le prélèvement?

-Est-ce un test fiable?

-Quel est cet examen?

-BUT: « Mettre en évidence un gène en théorie absent chez la mère «

-particularités du gène RHD:

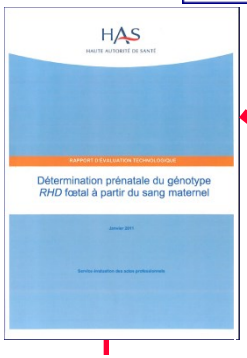


D positif

D négatif

Quel est l'intérêt de réaliser ce test?

Haute Autorité de Santé / Service évaluation des actes professionnels / janvier 2011



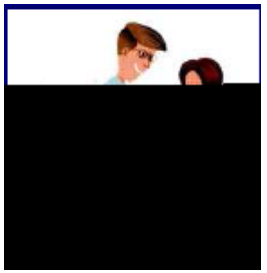
RHD

Ainsi, dans le cas de mère de phénotype RH:-1 (D négative) et de père de phénotype RH:1 (rhésus D positif), la connaissance du génotype *RHD* (rhésus D) du fœtus permettrait :

1) chez les mères déjà immunisées, d'identifier les grossesses devant faire l'objet d'un suivi spécifique spécialisé lourd si le fœtus est RH:1 (D positif) en raison du risque d'anémie fœtale. Dans le cas contraire : fœtus RH:-1 (D négatif), la grossesse suit le protocole de surveillance habituel ;

1) chez les mères déjà immunisées, d'identifier les grossesses devant faire l'objet d'un suivi spécifique spécialisé lourd si le fœtus est RH:1 (D positif) en raison du risque d'anémie fœtale. Dans le cas contraire : fœtus RH:-1 (D négatif), la grossesse suit le protocole de surveillance habituel ;

Comment est réalisé le prélèvement?



-réalisé à partir de 12 SA

-sur simple prélèvement veineux périphérique de la mère

-nécessite 2 tubes EDTA

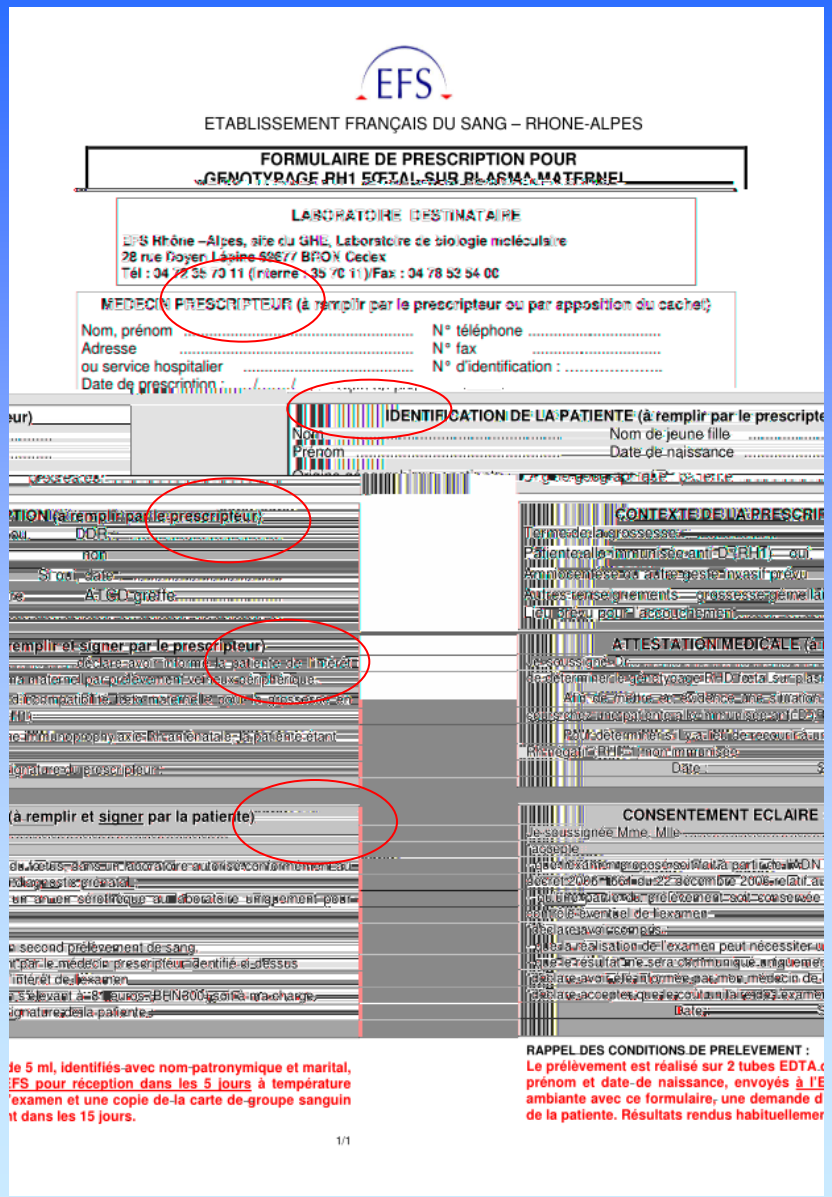
-à transmettre pour réception dans les 5 jours à température ambiante au

laboratoire EFS RA site de LYON GHE

-demande d'examen = ordonnance + formulaire de prescription

Prescription du Génotypage *RHD* fœtal: consentement éclairé, mode d'emploi

Qui doit le remplir?



ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG – RHONE-ALPES

FORMULAIRE DE PRESCRIPTION POUR
GENOTYPAGE RH1 FOETAL SUR PLASMA MATERNEL

LABORATOIRE DESTINATAIRE

EFS Rhône –Alpes, site du GHE, Laboratoire de biologie moléculaire
28 rue Royer, Lépine 69677 BRON Cedex
Tél : 04 72 35 70 11 (interne : 35 70 11)/Fax : 04 78 52 54 00

MEDECIN PRESCRIPTEUR (à remplir par le prescripteur ou par apposition du cachet)

Nom, prénom .....
Adresse .....
ou service hospitalier .....
Date de prescription : .....

N° téléphone .....
N° fax .....
N° d'identification : .....

IDENTIFICATION DE LA PATIENTE (à remplir par le prescripteur)

Nom .....
Prénom .....
Nom de jeune fille .....
Date de naissance .....

CONTEXTE DE LA PRESCRIPTION

ATTESTATION MEDICALE

CONSENTEMENT ECLAIRE

Je soussignée Mme, Mlle .....

RAPPEL DES CONDITIONS DE PRELEVEMENT :

1/1

1

2

3

4

5

Prescripteur

Patiente

Document obligatoire: en son absence, l'examen ne peut pas être réalisé!!

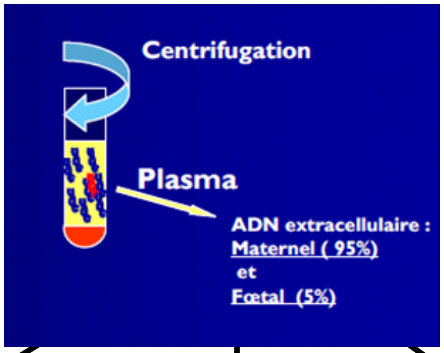
-Est-ce un test fiable?

LA TECHNIQUE: DOUBLE ENJEU

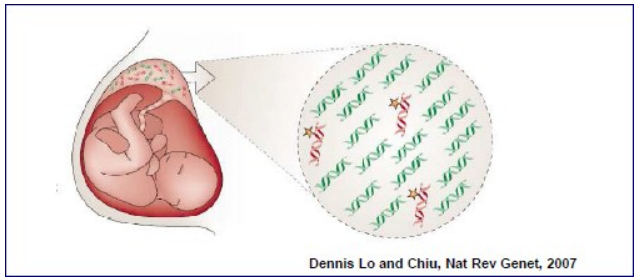
Simple en apparence mais:

-

-Gène parfois présent chez une mère pourtant RH:-1 (D négatif)

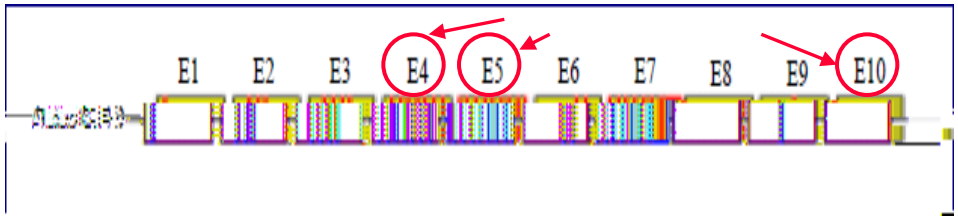


petites quantités d'ADN: test SENSIBLE



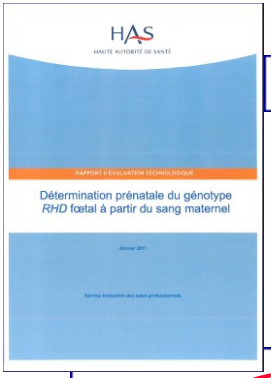
ADN fœtal = 5% de l'ADN total

détection du gène *RHD* fœtal : test SPECIFIQUE



Structure du gène *RHD*

La méthode utilisée au laboratoire celle mise au point par J.M.Minon, (Liège, Belgique)



Haute Autorité de Santé / Service évaluation des actes professionnels / janvier 2011

Minon *et al.* (66) ont indiqué que la détermination du génotype était réalisée en routine depuis 2002 chez les femmes déjà immunisées et à risque d'allo-immunisation. Les modalités de réalisation étaient proches de celles décrites par l'équipe de Finning : PCR en temps réel avec amplification des exons 4, 5 et 10 et utilisation du gène SRY, et CCR5 comme témoins du bon déroulement de la procédure et de l'amplification de matériel fœtal pour les fœtus masculins.

Les résultats étaient établis si l'amplification concomitante des 3 exons était constatée

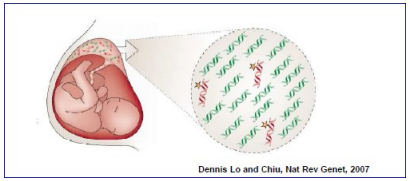
Deux cent dix-huit femmes ont été prélevées [illegible]

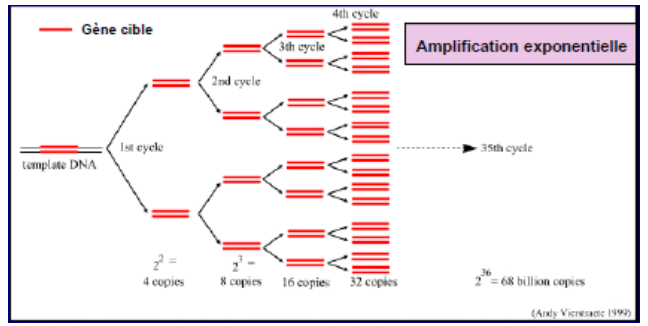
Dricot *et al.* (68), qui appartiennent à la même équipe que Minon, ont publié les résultats de leur série de patientes (il est difficile d'exclure la possibilité que ces

[36] le Rhésus D était considéré comme positif si 2 des 4 réplicats des exons 4, 5 et 10 étaient positifs et 3 réplicats additionnels d'un des exons atteignaient des valeurs seuils Ct < 42. Le rhésus était considéré comme négatif si au moins 11 des 12 réplicats n'étaient pas amplifié et si le SRY était positif (2 sur 4 réplicats) ou le gène *RASSF1A* était positif (2 sur 3 réplicats).

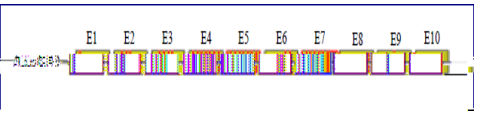
Haute Autorité de Santé / Service évaluation des actes professionnels / janvier 2011
- 45 -

AMPLIFIER L'ADN: PCR quantitative en temps réel

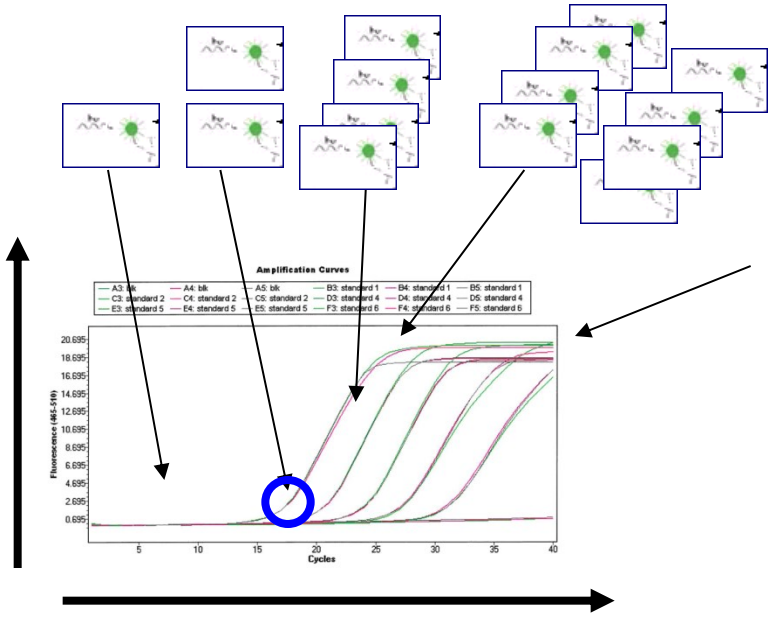




SENSIBILITE



SPECIFICITE:
3 niveaux de spécificité



2) Sondes, Amorces:

Exemple de résultat

Résultat

Interprétation

ÉTABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG - RHÔNE-ALPES

EFS Rhône-Alpes - Site du Groupement Hospitalier Est

Laboratoire d'Immuno-Hématologie n°69-190 — Tél. : 04.72.36.70.11

28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Cedex — Fax : 04.78.53.54.00

Biologistes : Pascalirie BRUCCA - Emmanuelle GUINCHARD — Tél interne HOL : 35.70.11

Compte rendu d'analyses biologiques de :

Patient 7008744722

CQE13P1LYONGHE Genotypage Rhd Feotal

DDN : (I)

Demande 1013040430

Votre référence : 13-01/01

Dossier enregistré le 23/01/13 09:45 terminé le 25/01/13

Prélèvement de sang du reçu le 10/01/13 à 11:25

EFS Rhône Alpes
CT LYON CARDIO/GHE
Etablissement Français du Sang
Hôpital Cardiologique
69500 BRON

Lyon, le 25/01/13

Génotypage RHD foetal sur plasma maternel

Technique : Amplification par PCR temps réel des exons 4, 5 et 10 du gène RHD

Résultat : positif

COMMENTAIRE :

Présence d'une amplification des 3 régions analysées du gène RHD.

Phénotype foetal attendu : RH1 POSITIF (RH:1).

Pour un suivi optimal du dossier, merci de nous renvoyer à la naissance la fiche de suivi de grossesse (ci-jointe) pour nous communiquer le statut RH1 du nouveau-né.

FIN DU COMPTE RENDU

Les informations contenues dans ces documents sont confidentielles et soumises au secret professionnel. Merci de nous contacter pour toute communication.

Toute reproduction partielle de ce document est interdite.

1/1

EFS

ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG

INFORMATION OBLIGATOIRE POUR L'EFS
(Tel. : 04.72.35.70.11)

IDENTIFICATION DE LA PATIENTE (ou étiquette)

Nom .....
Nom de jeune fille .....
Prénom .....
Date de naissance .....

IDENTIFICATION DU NOUVEAU-NE (ou étiquette)

Nom .....
Prénom .....
Date de naissance : .....
Sexe : ☐ M ☐ F

« Rhésus D » du nouveau-né (ou « Rh », « RH1»): ☐ Pos ☐ Neg

Renvoyer par Fax: 04.78.53.54.00

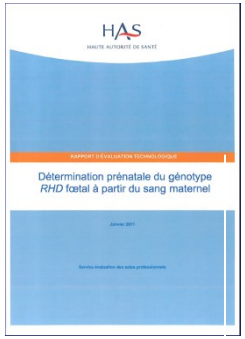
Suite au génotypage RHD fœtal réalisé en
MERCI D'AVANCE !

Fiche de suivi de grossesse

Résultat adressé uniquement au prescripteur

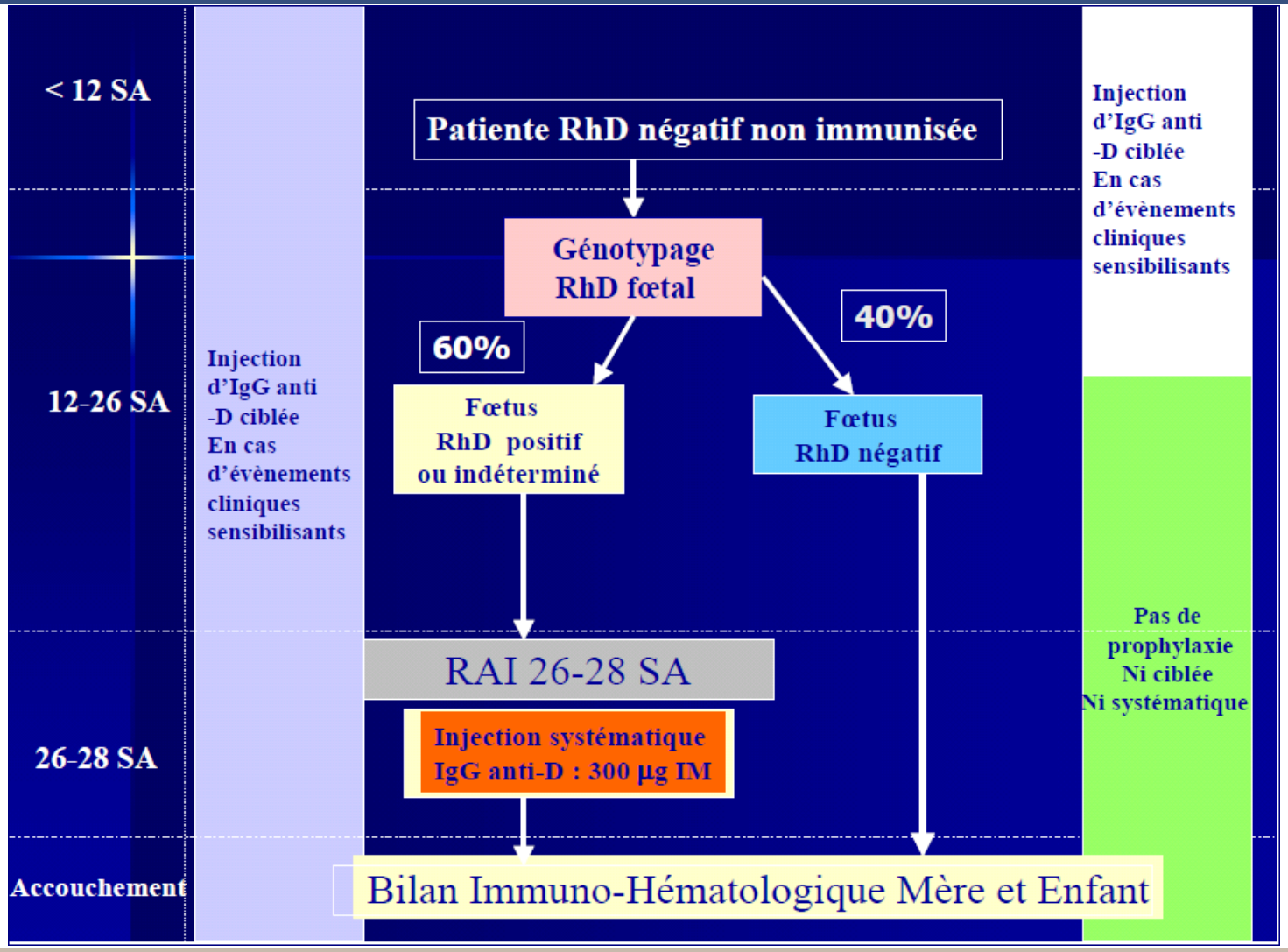
Cas n°2

Haute Autorité de Santé / Service évaluation des actes professionnels / janvier 2011



RHD

2) chez les mères non immunisées, d'identifier les grossesses devant faire l'objet d'une prophylaxie, si le fœtus est RH:1 (D positif) par immunoglobulines anti-RH1 (anti-D), produits dérivés du sang dont la disponibilité est limitée et dont les risques de transmission d'agents infectieux transmissibles par le sang bien que très rares ne peuvent être exclus.

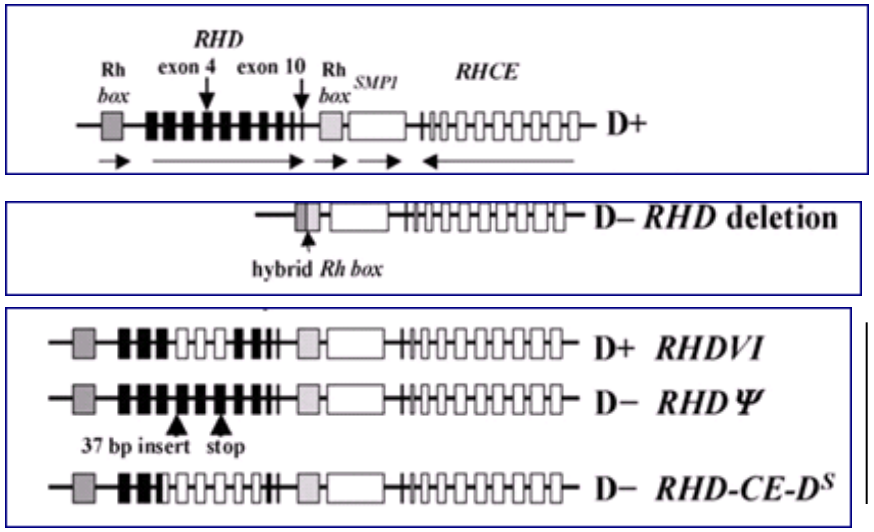

< 12 SA
12-26 SA
26-28 SA
Accouchement
Injection d'IgG anti -D ciblée En cas d'évènements cliniques sensibilisants
Patiente RhD négatif non immunisée
Génotypage RhD fœtal
60%
40%
Fœtus RhD positif ou indéterminé
Fœtus RhD négatif
RAI 26-28 SA
Injection systématique IgG anti-D : 300 µg IM
Bilan Immuno-Hématologique Mère et Enfant
Injection d'IgG anti -D ciblée En cas d'évènements cliniques sensibilisants
Pas de prophylaxie Ni ciblée Ni systématique

d'après A. Lévy-Mozziconacci

LA TECHNIQUE: DOUBLE ENJEU

Simple en apparence mais:

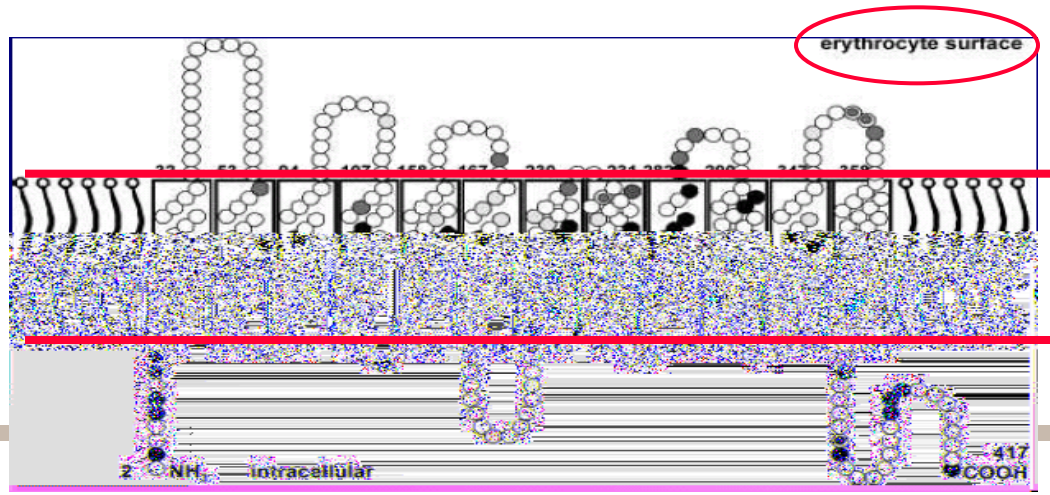
-Mise en évidence sur de petites quantités d'ADN



gène RHD présent:
Phénotype attendu: D POSITIF, RH:1

gène RHD absent (dit délété):
Phénotype attendu: D NEGATIF, RH:-1

gène RHD présent mais anormal (dit variant):
Rendu « Ininterprétable »



Membrane du globule rouge

EXON4	EXON5	EXON10	CARACTERISTICS	DENOMINATION
-	-	+	P	RH1 partial DVI type2
-	-	+	P	D variant type VI type?
-	-	+	P	African origin pseudo gene ψ or r's?
-	+	-	P	DHAR (*)
-	-	+	P immunogenicity+++	DVI type 3
-	-	+	P?	D partial III type4+ deletion exons 4 to 7
+	+	+	P	DNB(*)
+	+	+	F	D weak type10
+	+	+	F	D weak
+	+	+	F	D weak
+	+	+		Initially known as D- then D weak type 1
+	+	+		D weak type 5 without allo-immunisation
+	+	+	F	RH1 weak type11
+	+	+	F	D weak type?
+	+	+	F	D weak type?

« Known RHD gene variant forms tested by the method in 2010-2011 in EFS RA », OMIC's 2014, Baltimore

-
-
-
-
-
-

RHD

respect du délai d'envoi, fiche de consentement remplie, renseignements cliniques, ***peu de non-conformités***

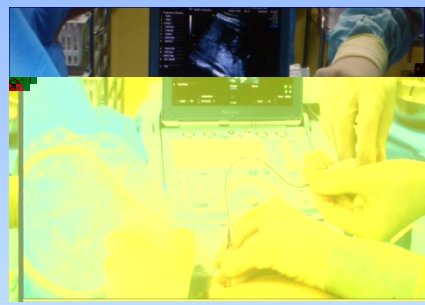
critères d'interprétation, ***cas des échantillons précoces***

selon l'indication ***cas des résultats ininterprétables***

DIFFICILE++++

-
-

Transfusion Clinique et Biologique 21 (2014) 1–14



EFS
ÉTABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG

AuroRe

RP2S
Réseau Périnatal des 2 Savoie

Hôpitaux de Lyon

U du 27 novembre 2014